

- For more records, click **Records** link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click **Display Selected**.
- To print/save clean copies of selected records from browser click **Print/Save Selected**.
- To have records sent as hardcopy or via email, click **Send Results**.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	Format
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Display Selected Free
Print/Save Selected	
Send Results	

1. ☐ 9/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010524746

WPI Acc No: 1996-021699/199603

Related WPI Acc No: 2003-150215

XRAM Acc No: C96-007508

Use of hyaluronic acid - for prepn. of medicament for treating thrombotic condition

Patent Assignee: GENZYME CORP (GENZ); UNIV BOSTON (UYBO-N)

Inventor: BURNS J W; VALERI C R

Number of Countries: 012 Number of Patents: 008

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 686395	A2	19951213	EP 95303739	A	19950601	199603 B
AU 9520004	A	19951214	AU 9520004	A	19950511	199606
CA 2148977	A	19951208	CA 2148977	A	19950509	199614
BR 9502691	A	19960305	BR 952691	A	19950606	199615
JP 8053356	A	19960227	JP 95166851	A	19950607	199618
US 5585361	A	19961217	US 94255252	A	19940607	199705
EP 686395	A3	19970226	EP 95303739	A	19950601	199717
AU 701273	B	19990121	AU 9520004	A	19950511	199915

Priority Applications (No Type Date): US 94255252 A 19940607

Cited Patents: 3. Jnl. Ref; EP 269937; WO 8606729; WO 9407505

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 686395	A2	E	31	A61K-031/72	

Designated States (Regional): DE ES FR GB IT NL SE

AU 9520004 A A61K-031/725

CA 2148977 A A61K-031/725

BR 9502691 A A61K-031/715

JP 8053356 A 29 A61K-031/725

US 5585361 A 24 A61K-031/70

EP 686395 A3 A61K-031/72

AU 701273 B A61K-031/725 Previous Publ. patent AU 9520004

Abstract (Basic): EP 686395 A

Use of hyaluronic acid (HA) in the prepn. of a medicament for treating a thrombotic condition in a mammal or for preventing the formation of a thrombus in a mammal at risk of developing thrombosis comprises admin. of a medicament in a dosage effective to inhibit the adherence and aggregation of platelets. Also claimed is a prosthetic device coated with HA in an amt. to inhibit the interaction of platelets with the device.

USE - HA can be used to prevent platelet adhesion and subsequent aggregation to a damaged vessel wall caused by cardiac surgery, particularly a cardio-pulmonary bypass, catheterisation, particularly cardiac catheterisation, more particularly percutaneous transluminal coronary angioplasty, atherotomy or placement of a prosthetic device, particularly a cardiovascular valve, a vascular graft or a stent.

Dwg. 0/13

Title Terms: HYALURONIC; ACID; PREPARATION; MEDICAMENT; TREAT; THROMBUS; CONDITION

Derwent Class: B04; P34

International Patent Class (Main): A61K-031/70; A61K-031/715; A61K-031/72; A61K-031/725

International Patent Class (Additional): A61L-027/00

File Segment: CPI; EN

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

☒ Select All☒ Clear Selections

Print/Save Selected

Send Results

Display Selected

Format

Free

© 2005 Dialog, a Thomson business

(11)特許出願公開番号

特開平8-53356

(43)公開日 平成8年(1996)2月27日

(51) Int.Cl.⁸

A 6 1 K 31/725

識別記号

ACB

ABN

ABX

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数32 FD (全 29 頁)

(21)出願番号 特願平7-166851

(22)出願日 平成7年(1995)6月7日

(31)優先權主張番号 08/255, 252

(32)優先日 1994年6月7日

(33)優先權主張国 米国 (US)

(71)出願人 595094596

ゲンザイム コーポレーション

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
ンブリッジワン ケンダル スクエア
(番地なし)

(71)出願人 595094600

トラステイズ オブ ボストン ユニバ
ーシティ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
ストン ベイステート ロード 147

(74)代理人 弁理士 清水 初志

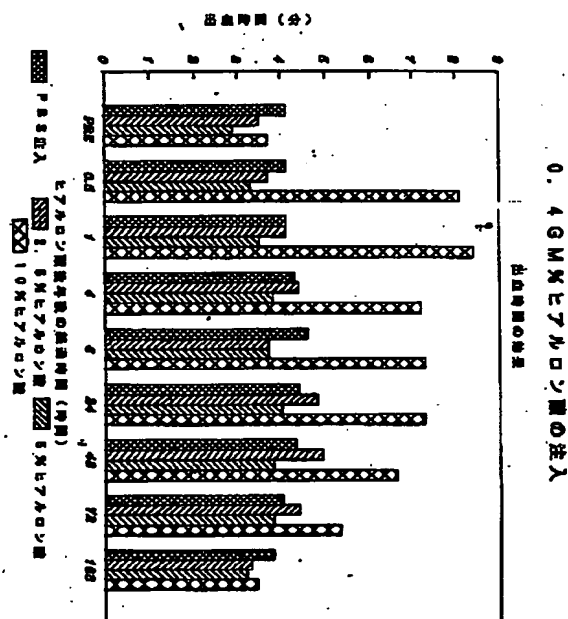
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板の粘着及び凝集の阻害

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 ヒアルロン酸を含む薬剤の組成を投与することによって血栓症状を阻害または処置する方法を提供する。

【構成】 血小板の粘着と凝集を阻害する効果を奏する量の薬剤を動物に投与することによって、該動物の血栓症状を処置する該薬剤の調製における、ヒアルロン酸の使用。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 血小板の粘着と凝集を阻害する効果を奏する量の薬剤を動物に投与することによって、該動物の血栓症状を処置する該薬剤の調製における、ヒアルロン酸の使用。

【請求項 2】 請求項 1 の使用において、血栓症状が静脈血栓症であることを特徴とする使用。

【請求項 3】 請求項 2 の使用において、動物が妊娠している動物であることを特徴とする使用。

【請求項 4】 請求項 1 の使用において、血栓症状が動脈血栓症であることを特徴とする使用。

【請求項 5】 請求項 4 の使用において、血栓症状が冠状動脈血栓症であることを特徴とする使用。

【請求項 6】 血小板の粘着と凝集を阻害する効果を奏する量の薬剤を動物に投与することによって、血栓症が拡大する恐れのある、該動物の血栓の形成を阻害する該薬剤の調製における、ヒアルロン酸の使用。

【請求項 7】 請求項 6 の使用において、動物が、止血を崩壊させるような疾患が原因で血栓が成長する恐れが増加している動物であることを特徴とする使用。

【請求項 8】 請求項 7 の使用において、医学的状態がヘパリンに誘導された血小板減少であることを特徴とする使用。

【請求項 9】 請求項 7 の使用において、医学的状態が冠状動脈症であることを特徴とする使用。

【請求項 10】 請求項 7 の使用において、医学的状態がアテローム性動脈硬化症であることを特徴とする使用。

【請求項 11】 請求項 6 の使用において、動物が、医学的状態が原因で血栓が成長する恐れが増大している動物であることを特徴とする使用。

【請求項 12】 請求項 11 の使用において、医学的状態が心臓手術であることを特徴とする使用。

【請求項 13】 請求項 12 の使用において、医学的状態が心肺バイパス手術であることを特徴とする使用。

【請求項 14】 請求項 11 の使用において、医学的状態がカテーテル挿入であることを特徴とする使用。

【請求項 15】 請求項 14 の使用において、カテーテル挿入が心臓カテーテル挿入であることを特徴とする使用。

【請求項 16】 請求項 15 の使用において、カテーテル挿入が経皮経管血管形成術であることを特徴とする使用。

【請求項 17】 請求項 11 の使用において、医学的状態が沈着したのり状物質の切開手術であることを特徴とする使用。

【請求項 18】 請求項 11 の使用において、医学的状態がプロテーゼデバイスの設置を含むことを特徴とする使用。

【請求項 19】 請求項 18 の使用において、プロテー

ゼデバイスが冠状動脈弁であることを特徴とする使用。

【請求項 20】 請求項 18 の使用において、プロテーゼデバイスが血管移植片であることを特徴とする使用。

【請求項 21】 請求項 18 の使用において、プロテーゼデバイスがステントであることを特徴とする使用。

【請求項 22】 請求項 1 または 6 の使用において、投与が全身的であることを特徴とする使用。

【請求項 23】 請求項 1 または 6 の使用において、投与が局所的であることを特徴とする使用。

【請求項 24】 請求項 1 の使用において、HA が血栓溶解剤による処置の後に投与されることを特徴とする使用。

【請求項 25】 請求項 1 の使用において、HA が血栓溶解剤と同時に投与されることを特徴とする使用。

【請求項 26】 請求項 11 の使用において、HA が前述の医学的状態である期間を通して投与されることを特徴とする使用。

【請求項 27】 デバイスと血小板の相互作用を阻害するのに十分な量のヒアルロン酸によって被覆されたプロテーゼデバイス。

【請求項 28】 請求項 27 のデバイスにおいて、プロテーゼデバイスが合成されたものであるデバイス。

【請求項 29】 請求項 27 のデバイスにおいて、プロテーゼデバイスが生体由来のものであるデバイス。

【請求項 30】 請求項 27 のデバイスにおいて、プロテーゼデバイスが冠状バルブであるデバイス。

【請求項 31】 請求項 27 のデバイスにおいて、プロテーゼデバイスがステントであるデバイス。

【請求項 32】 請求項 27 のデバイスにおいて、プロテーゼデバイスが血管移植片であるデバイス。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、ヒアルロン酸の投与による血小板の粘着及び凝集の阻害に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 血管が損傷を受け、血管細胞の通常の内皮下細胞障壁 (endothelial-cell barrier) が壊れた際、血小板が直ちに周りの血液から集められ、閉塞血栓を形成する。この反応は、血小板と巨大分子 (macromolecules) との相互作用を通じて、内皮下マトリックス (subendothelial matrix) 中で (血小板粘着)、また血小板自身の間で (血小板凝集) 起こるものである。粘着の最初のプロセスは、凝集とは対照的に、代謝活性を必要としない。しかしそれは、血漿粘着因子の活性化を促進する多くの因子を順番に分泌させるような血小板の活性化を導き、その結果血小板凝集体を補強するようなフィブリン塊の生成に至る。通常の止血環境下では、血小板凝集体とフィブリン塊は、損傷部位の治癒が起こるにつれて、分解される。

【0003】 血栓症は、血小板凝集体及びフィブリン塊

またはその一方が血管を閉塞させるという病的過程である。静脈血栓症と肺栓塞は、入院治療を要する患者が不健康となり、死に至る代表的事由のひとつである。放射性ラベルしたフィブリノーゲンの研究は、通常の鼠径ヘルニアが進行する50歳以上の全患者の約4分の1、前立腺切除術あるいは股関節手術 (hip surgery) を受けた患者の2分の1以上、急性心筋梗塞の患者のおよそ3分の1における、下肢の静脈性血栓を明らかにしている。この病的過程にかかりやすくなる要因としては、外傷後及び手術後固定 (posttraumatic and postoperative immobility) (特に中年、老年、あるいは心臓血管手術 (cardiovascular procedures) 後の患者において、その傾向が強い)、妊娠、静脈血栓症の前段階 (previous episodes of venous thrombosis)、経口避妊薬の使用、ネフローゼ症候群、真性赤血球増加症、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease)、ホモシステニン症、高ホモシステニン症、発作性夜間血色素尿症、ショック、うっ血性心障害 (congestive heart failure) などがある。

【0004】血管内のみでのプロセスとして生じる血栓症は、アテローム性動脈硬化症の主要な因子でもある可能性がある。ほぼ間違いのない発症機構 (この機構によって、アテローム性動脈硬化部位が深刻な血流妨害と血管全域における閉塞に進行する) において、動脈内に沈積した脂肪 (atheromatous plaques) の表面上で起こる血小板凝集の形成と、それに引き続くこれら白色血栓が繊維性閉鎖動脈内膜損傷部位 (fibrous occlusive intimal lesions) に至る組織化、すなわち、心筋梗塞へと至る冠状動脈血栓症は、ほとんど常に、動脈内の脂肪沈積部位で起こっている。経皮経管冠状血管形成術 (PTCA) は、一部閉塞しかかった血管から心臓へ至る血流を再構成するための重要な対処法となってきた。残念なことに、冠状血管形成術を受けた患者のおよそ30%から40%が、治療後6カ月以内に、処置した血管の再狭窄にかかっている。つまり、現在のところ血管の再狭窄を防止する信頼に足る方法は、存在しない。そのため、バイパス手術、あるいは他のPTCA処置などのような血管再生手術 (revascularization procedure) が、よく必要とされている。

【0005】様々な疾患の状態と外科手術に関連する血栓形成の防止と処置のための現在の治療法は、主として抗凝血剤ヘパリンまたはワルファリンの使用に集中している。最も一般的で基礎的な治療は、通常迅速なヘパリン投与 (heparinization) を含むが、血栓症の再発の危険が長引く場合には、ワルファリンの長期投与を続に行う方がよい。

【0006】ヘパリンは血小板からのセロトニンとトロンボキサンA₂の放出を阻害する。これらの血管作動性物質 (vasoactive substances) は、強肺動脈高血圧、急性右側血行障害 (acute right-side hemodynamic failure)

re)、肺塞栓症に関連して起こる心臓性ショックの誘導物質と考えられている。血栓の広がり防止し、血小板の放出を防止するヘパリンの迅速な薬効が、それを用いる最大の理由である。しかしながら、度々起こるヘパリン投与の併発症は、強い出血である (通常48時間後)。そうした出血は、それが頭蓋骨内で起こったとき、特に危険である。出血の危険性はその出血量に依存し、また女性、重度疾病患者、大量のアルコールを摂取する人、ヘパリンとアスピリンを併用している人において危険性が高い。ヘパリンの作用は、硫酸プロタミンの静脈注射によって中和されるが、プロタミンの使用は、いくつかの術後併発症と関係がある。それに含まれるのは、術後性全身低血圧症、アレルギー反応、重篤な肺血管狭窄 (catastrophic pulmonary vasoconstriction)、急性肺高血圧症、補体活性化 (complement activation)、非心臓性肺水腫、減少する心拍出 (decreased cardiac output)、血小板減少症/白血球減少症などである。

【0007】プロタミン (通常魚類から単離される) はヒト免疫系に外来タンパク質として認識され得るので、以前からプロタミン投与を受けている患者 (例えば、プロタミン・インシュリンを投与されている糖尿病患者は、引き続き投与によって著しい危険性にさらされている (Just Viera, Amer. Surgeon 50:151, 1984)。加えて、補体活性化による非免疫性経路が、ヘパリンの抗凝血のプロタミン逆転の間を通して観察される、多くの急性反応の原因であると考えられるとの研究報告がなされている。

【0008】ワルファリンは、肝ミトコンドリア内のI, VII, IX, X因子のビタミンK依存性の合成において、グルタミン酸残基のγ-カルボキシル化に影響を与える。薬剤は完全に吸収され、血漿中で顕著にタンパク質と結合するが、その半減期は42時間である。それは肝臓内で分解され、その代謝生成物 (それは不活性である) は、尿及び便中に排泄される。しかし、ワルファリンは、肝臓内で既に形成され、循環系に放出される前抗凝血タンパク質 (procoagulant proteins) には影響を及ぼさない。また、これら因子のうちいくつかの半減期は24時間よりも長いので、それゆえこの薬剤の抗凝血効果は数日遅延して現れる。これに加えて、多くの薬剤がワルファリンと重大な相互作用をする上、ある家系において、ワルファリンに対する遺伝性耐性が常染色体の優性特徴として存在する。

【0009】ヘパリン投与が血栓形成の進行を止めるのに効果が見られない場合、あるいは閉塞が急性で生命を脅かす恐れがあるような場合に、血栓崩壊治療が通常用いられる。3種類の血栓崩壊性薬剤が、現在用いられている。すなわち、ウロキナーゼ (ヒト胎児腎臓細胞から得られ、プラスミノーゲンを解裂させてプラスミンへ変える)、ストレプトキナーゼ (ストレプトコッカス属細

菌から得られ、プラスミノゲンと複合体を作り、活性化させる)、そして組織プラスミノゲンアクティベーター (rtPA) である。これら薬剤は血栓溶解を促進するが、止血のためのフィブリンをも溶解して、血管壁出血を引き起こすことがある。それゆえ、ヘパリンあるいはワルファリンとこれら血栓崩壊性薬剤を併用することは、通常避けられている。加えて、非組織プラスミノゲンは発熱因子及び強力なアレルギーである。特にストレプトキナーゼは、過敏症に関係がある。

【0010】妊娠期間中の静脈血栓症はよく見られる症状であるが、肺塞栓症は母体死を引き起こす主要な理由であるから、妊娠期間中の抗凝血療法は、重大な治療上の問題を提起している。ワルファリンは胎盤に混入し、胎児に影響を与える。加えて血管性出血を併発することにも関連がある。胎児障害、鼻骨形成不全、変形した骨の成長、凹凸を生じた骨端は、明らかにクマリン誘導体のせいである。その投与において危険な期間は、妊娠後6週から12週の間であることがわかっている。重度の胎児中枢神経系の異常、例えば精神遅滞、盲目、嚥下、痙攣性、てんかん発作などは、あまり見られない。これら欠陥は、投与におけるいずれの危険期間とも関係なくあらわれ、第2トリメスター及び第3トリメスターを通じたワルファリンの投与に関係があると思われる。様々な先天的視覚異常もまた、ワルファリン治療の後に報告されている。

【0011】ヘパリンは胎盤に混入はしない。また現在、投与量を調整したヘパリンは、静脈血栓塞症 (venous thromboembolism) を併発した妊娠期間中を通じて、好んで用いられる抗凝血剤である。しかし、ある調査では、ヘパリンを投与した妊娠のおよそ8分の1で死産に終わり、母体の5分の1が未熟児を出産し、うち3分の1が死亡した。妊娠中のヘパリンの投与に関連する他の問題は、保留胎盤、胎盤の早期剥離、小血腫である。

【0012】

【発明を解決するための手段】本発明者らは、ヒアルロン酸が、血小板のフォン・ウィルブランド因子 (vWF) と内皮下マトリックスの構成因子との相互作用に干渉して、血小板の凝集と粘着を効果的に阻害することに使用できることを、見いだした。それ故、この新しい知見は、病的である、あるいは病的になり得るような多くの症状において、血小板の粘着と凝集の阻害するためのヒアルロン酸の使用を可能にする。

【0013】ある側面において、本発明は、動物の血管系中で血小板の凝集と粘着を効果的に阻害する量のヒアルロン酸を含む治療成分を動物に対して投与することで、動物、とくにヒトの血栓状態を処置する方法を特徴とする。

【0014】この側面の好ましい態様において、血栓状態とは静脈血栓症、特に肺塞栓症 (例えば、腸骨大腿

骨血栓症、腸間膜血管血栓症)、バド・チアリ症候群 (Budd-Chiari syndrome) への悪化を導き得るような静脈血栓症である。本方法は、妊娠期間中の静脈血栓症の処置において、特に有用である。

【0015】この側面の好ましい他の態様において、血栓状態とは動脈血栓症、特に冠状動脈血栓症である。

【0016】二つめの側面において、本発明は、血小板の凝集と粘着を効果的に阻害する量のヒアルロン酸を含む治療成分を動物に対して投与することで、血栓症が悪化する危険がある際に、動物において血栓の形成を阻害する方法を特徴とするものである。

【0017】この側面の好ましい態様において、動物は、血流遮断を解消させる治療によって、血栓が成長する危険性の増大にさらされているが、ここでは以下の症状を含む。すなわち、ヘパリンに誘導される血小板減少症、冠状動脈症、アテローム性動脈硬化症、妊娠、発作、新形成、肥満症、全身深在性エリテマトーデス、ネフローゼ症候群、真性赤血球増加症、炎症性腸疾患、ホモシスチン症、高ホモシステイン症、発作性夜間血色素尿症、ショック、うっ血性心障害である。

【0018】この側面の好ましい他の態様において、動物は、以下の医療方法に由来する血栓が成長する危険性の増大にさらされている。すなわち、心臓手術、心肺バイパス、カテーテル挿入、心臓カテーテル挿入、経皮経管血管形成術、沈着したのり状物質切開術 (atherotomy) である。これには、人工または生体由来のプロテーゼ (a synthetic or bioprosthetic prosthesis) (例えば心臓動脈弁) を配置する処置をも含んでいる。

【0019】本発明のこれらの側面のいずれにおいても、ヒアルロン酸 (以下HAと略記することがある) は全体的にあるいは局所的に投与してよい。HAの投与は、医療処置に先だって、処置の間中、あるいは処置後であってよいし、あるいは他の薬剤とともに用いてもよい (たとえば血栓溶解剤など)。

【0020】また他の側面において、本発明には、プロテーゼデバイス (prosthetic device) が血小板にさらされるよりも前に、その器具の表面と血小板との相互作用を阻害するのに十分な量のヒアルロン酸を用いることによって、プロテーゼデバイスを被覆し、その表面への血小板の粘着を阻害する方法という特徴もある。

【0021】そうしたデバイスは、あらゆる適当な生体適合性材料で作ることが可能であるが、それは全てまたは一部を合成したものであり、医療行為において通常用いられるものである。好ましい態様では、プロテーゼデバイスは冠状バルブ、血管移植片 (vascular graft)、ステントである。

【0022】また、本発明の好ましい態様において、血小板粘着を阻害するための、血中への全身系投与のHA溶液濃度は、0.1%から0.4% (重量パーセント) の範囲であり、患者の総血液量のおよそ5%以上、15%

以下の量を投与される。HA溶液の粘度は、1000センチポアズ以下、20センチポアズ以上であるべきである。HAの分子量は、特別なHA濃度を実現するために要求された粘度によって、調整されることが可能である。望ましくは、HAの平均分子量が 1×10^5 ダルトンより大きいことで、より望ましいのは、 2.25×10^5 と 2.0×10^6 の間であり、さらに望ましいのは、 7.0×10^5 と 2.0×10^6 の間である。

【0023】血小板粘着を阻害しようとする部位における、HA溶液の局所的投与のためには、HA濃度は、20センチポアズから30000センチポアズまでの範囲のHA溶液粘度の場合、0.1%から5.0%までが可能である。

【0024】HAの分子量は、ユー・L・P (Yu L.P.) らによって「*Rheological Characteristics of microbially Derived Sodium Hyaluronate*」、American Chemical Society Proceedings Series - Harnessing Biotechnology for the 21st Century, M.R. Ladisch and R.B. Rose eds., p 80-84, 1992」に報告された光散乱測定法によって決定できる。

【0025】ここで記載された粘度は、10%フルスケールよりも高い結果をもたらすような最も低いせん断率を用いて、ブルックフィールドコーン (Brookfield cone) とプレート粘度計によって決定することが可能である。

【0026】本明細書において、ヒアルロン酸 (HA) という単語は、ヒアルロン酸自体とあらゆるそのヒアルロネート塩を意味しているが、これには例えば、ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸マグネシウム、ヒアルロン酸カルシウムが含まれる。

【0027】ここで用いられた「血小板凝集」という単語は、血小板間の特異的相互作用を通じて、個々の血小板が互いに集まることを意味している。

【0028】ここで用いられた「血小板粘着」という単語は、血小板と表面 (例えば、血管壁 (vascular wall)、プロテゼデバイス) との相互作用を通じて、表面上に血小板が集まることを意味している。

【0029】ここで用いられた「狭窄 (restenosis)」と「閉塞 (reocclusion)」という単語は、管あるいは管路の直径が狭くなったり、締め付けられたりすることを意味している。

【0030】ここで用いられた「全身系の」投与という単語は、通常、静脈内投与によって、物質が効くことを意図された場所から十分に離れた距離で、物質を投与することを意味している。

【0031】ここで用いられた「局所的投与」とは、治療薬剤 (例えば、HA) が、その治療効果を求められている身体の組織のごく近傍において、接触することを意味している。

【0032】別に定義されているものの他は、ここで用

いられた全ての技術並びに科学用語は、本発明が属している技術における当業者の一部によって普通に理解されているのと同じ意味を有する。ここに記載された方法や材料に相似していたり同等であったりする方法や材料が、本発明の実行や試行において用いられることが可能であるが、最も適当な方法と材料が、ここに記載されている。以下で言及されている出版物は、参照として、本明細書に組み入れられている。他で言及されているものの他は、ここで用いられた、あるいは意図された技術は、本技術の当業者によく知られている標準的な方法論である。材料、方法及び具体例は、単に示されただけのものであり、制限として意図されたものではない。

【0033】本発明者らは、ヘパリンやワルファリンと違って、他の止血作用に影響を与えることのない特殊な方法で、血小板粘着と凝集に影響を及ぼすために、HAを用いることが可能であるということを見いだした。例えば、本発明以前には、PTCA処置に引き続く血管再閉塞を防止するためによく用いられた方法は、血管の開放性を維持するために行う血管形成の部位にステントデバイスをおくことであり、ステントへの血小板の粘着を抑えるためにヘパリンを投与することである。しかしながら、ヘパリンは、影響が及ぶ血管の部位において、常に望ましいとは限らない、血液凝固の様々な効果を有している。すなわち、ヘパリンは、通常の血小板機能の強力な制御因子であるトロンボキサン の産生に影響を与える。ヘパリンはまた、一般的な環境下で、凝塊の溶解を導くような、繊維素溶解活性も有している。

【0034】これに対して、本発明の方法は、病的状態あるいは様々な医療処置に関連する病理性血栓形成の危険性を減少させることを行えると考えられる。ここでいう医療処置とは、全体の止血に影響を及ぼす危険性を大幅に減らした上での心臓血管手術、心肺バイパス、カテーテル挿入 (例えば、心臓カテーテル挿入、血管形成術) である。更に、HAは、ヘパリン処置及びワルファリン処置あるいはそのどちらかが用いられないような場合において、特に有用であろう。その具体例としては、プロタミンアレルギー、ヘパリンに誘導された血小板減少、ワルファリン耐性を示している患者、同様にワルファリンに不適合性のある薬剤を処置されている患者、あるいは妊婦である。

【0035】本発明の他の特徴及び有利な点は、以下の記述及び請求項から明らかである。

【0036】ヒアルロン酸 (HA) は、進化を通じて保存されてきた、動物細胞の細胞外マトリックスの構成成分である。このムコ多糖は、[D-グルクロン酸 (1-β-3) N-アセチル-D-グルコサミン (1-β-4)]_n ([D-glucuronic acid (1-β-3) N-acetyl-D-glucosamine (1-β-4)]_n) という構造を有する二糖類の繰り返しからなる直鎖状ポリマーである。それはヒトの全身各所に遍在し、以下の様々な組織中で通常の構成素と

して幅広い形態で見つっている。この様々な組織とは、滑液、硝子体液、血管壁、心膜液、臍帯などである。

【0037】ヒアルロン酸は、血液中に低濃度で存在している。それは、リンパを経た末梢組織由来である (Laurent et al., Biochem. Int. 2:195, 1981)。血液中のヒアルロン酸の濃度と、ラベルされたトレーサーによって計測されたその代謝回転速度から、10-100mgの全量が、毎日成人の血液循環中で代謝されていると、算定されている (Fraser et al., In The Biology of Hyaluronan, Ciba Foundation Symposium 143:41-59, Wiley, Chichester, England)。

【0038】ヒアルロン酸の希釈溶液は(非抗原性であることに加えて)、極めて潤滑性(lubricous)が強く、非常に薄い濃度においてさえ、そうした性質を示す。HA溶液は、腹部(Urman et al., Fertil Steril 56:563, 1991)及び整形外科手術(Hagberg et al., J H and Surg 17A:935, 1992)に引き続く術後性粘着形成を減少させることを示している。

【0039】その抗粘着効果に加えて、HA溶液は、その材質の独特の粘弾性によって、眼科、整形外科、口腔／顎顔面手術において、臨床学的に用いられてきた。その高い粘性ゆえ、投与されたHA溶液は、目の前眼房にとどまり、眼内水晶体移植の間中ずっと、傷つきやすい角膜の内皮面に保護を与える(Pape et al., Ophthalmology 87:699, 1980)。変形性関節症(Iwata, Clin Orthop 289:285, 1993)及びある種の側頭下顎関節の障害(Bertolami et al., J Oral Maxillofac Surg 51:232, 1993)の手術において、関節空間に注入されると、HA溶液は潤滑油のようにふるまって、苦痛軽減の効果を与える。興味深いことに、題目のHA溶液は、鼓膜穿孔の治療においてもまた、有益であることが示されている(Hellstrom et al., Acta Otolaryngol 442:54, 1987)。

【0040】本発明において投与される組成物は、摂取可能な担体、好ましくは水性担体(aqueous carrier)に溶解もしくは懸濁したHAの溶液を含んでいる。さまざまな水性担体を用いることが可能であり、例えば水、緩衝液化した0.9%食塩水、それに類したものなどが用いられる。そうした組成は、pH調整及び緩衝化薬剤、浸透圧調整剤、保湿剤及びそれに類するもののよう、ほぼ生理状態に近づけるのに必要とされている、製剤上摂取可能な補助物質を含んでいてよい、例えば、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン、などを含んでいる。

【0041】投与は、間欠性注入(intermittent injections)(例えば、内在する血管内カニューレへの投与)によっても、またはポンプを用いた絶え間のない速度での注入によっても、いずれの方法でもよい。効果的な投与量を決めることは、患者の体重によってさまざま

に変わり、また、多くの因子によって影響されると考えられる。それには、投与の経路、疾患のタイプと状態、ある患者の全体的な健康状態などが含まれる。

【0042】より明確に言えば、HAは、本明細書で言及したあらゆる医学的状态によって引き起こされた損傷した血管壁に対する、血小板粘着とそれに続く凝固を阻害するのに用いることが可能である。これは、例えば、静脈内または動脈内カテーテルを用いるなどの標準的な方法によって、内皮下損傷からは離れた循環部位に、0.4%のHA溶液を、好ましくは生理学的緩衝剤中で注入することにより、達成することができる。HA溶液は患者の血液体積の5%以上の量を投与するが、あるいは患者の血液体積の10%の方が好ましい。

【0043】別の方法としては、HAは内皮下損傷部位に直接投与することも可能である。これを達成することを可能にした方法は、内皮下細胞損傷部位に直接カテーテルを設置し、損傷部位の近傍にHAをゆっくり投与することである。この場合、HA溶液の効果的な量は、内皮下細胞損傷部位に離れたところから溶液を投与するときに必要なとされる量よりも少ないであろう。

【0044】後者に特異的な具体例は、経管冠状動脈形成術(PTCA)によって引き起こされた損傷内皮での、血小板粘着の阻害である。この方法では、バルーンが付いたカテーテルを、一部閉塞した冠状動脈に挿入する。動脈の内径を広げることを目的としてバルーンを膨らませ、その結果血管を流れる血液流動を改善する。この方法は、しばしば動脈の内皮下に損傷を与えるが、それは、損傷血管壁上で、循環する血液細胞の望ましくない沈澱を導いてしまう。血管壁に粘着する細胞は、血小板、白血球、顆粒球(granulocytes)を含む。バルーンを膨らませることに続いて、カテーテルを抜くことに先立ち、損傷した血管壁に血小板または顆粒球が粘着することを止めるために、0.1%から0.5%のHA溶液を、血管形成部位のすぐ近傍に、カテーテルを通して注入する。これら細胞の血管壁への粘着を減少させることによって、血管の流通性(vessel patency)が維持され、血管の再開塞(vessel reocclusion)が少なくなり、あるいは阻害される。

【0045】この方法におけるHA溶液の使用は、沈着したのり状物質の切開術(artherotomy)に引き続いてもまた適用が可能である。この切開術も、血管壁を損傷し、それ故血小板沈澱、血栓症、再開塞を引き起こす。

【0046】HAはまた、コラーゲンまたは合成血管移植片、天然または人工心臓弁、血管ステント、他の血液と接触する製品及び血液透析膜、カテーテル、チューブ類などの材料のような、血管プロテアーゼへの血小板粘着を阻害もしくは減少させるためにも用いることが可能である。これらの材質への血小板の粘着を阻害することは、標準的な方法を用いた際に血液と接触することになるようなプロテアーゼもしくは血液に接触する材料の表面を、

HA、あるいはその誘導体で被覆することによって達成される。血液に曝したとき、血小板は、非HA被覆面と比較して、その表面に粘着しにくくなっている。あらゆるデバイスを、その使用に先立ち、熟練した当業者に既知の標準的細胞粘着アッセイによって、テストすることが好ましい。例えば、血小板懸濁液を含む小量のサンプルを、濃縮HAもしくはHAで被覆されたデバイスと共に生理的温度でインキュベートし、それから、例えば、ニューバウアーチャンバー (Neubauer chamber) にサンプルを入れ、光学式顕微鏡を用いて、2個もしくはそれ以上の凝集物中にみられる血小板の割合を評価する (あるいは、別の方法としては、調べるデバイスの表面に結合した血小板の割合によって、評価できる。

【0047】上述の記載より、当業者においては、本発明の本質的特性を容易に確認することが可能であり、それについての本質と範囲から離れることなく、種々の使用法や状況に対応するために、本発明にさまざまな変更と修正を行うことが可能である。例えば、vWFの活性を阻害できるようなHAのホモログ、アナログ、誘導体、複合体を本発明の方法においても用いることが可能であると考えられる (例えば、Balasz, U.S. Patent No. 4582865; De Belder PCT Publication No. W086/00912; Mals on et al., PCT Publication No. 84/20560; Prestwich et al., EP Publication No. 0416250A2; Hamilton et al., U.S. Patent No. 4937270; Burnset al., U.S. Patent No. 5017229); あらゆる個々のHAの化合物は、本明細書に記述された方法に従って効果をテストすることができる。

【0048】加えて、本発明はまた、血小板がすでに粘着した部位に直接用いる臨床学的薬剤を運搬するHAとそれを化学的に修飾した誘導体の使用をも含んでいる。例えば、HA分子に対する化学的結合によって、あるいはその薬剤とHAとの間のイオン性相互作用によって、薬剤を混在させ、または固定化することで、HAに包含させることが可能である (例えば、Sparer et al., 1983, Chapter 6, pp. 107-119, In Controlled Release Delivery Systemes, Roseman et al., (ed), Marcel Dekker, Inc.: New Yorkを参照)。HA-薬剤の複合体、すなわちHA誘導体の複合体は、vWFに結合することができ、血小板に特異的な結合部位、あるいは損傷した血管壁に、薬剤を運ぶことが可能である。特定の具体例としては、組織プラスミノゲン活性化因子 (tissue plasminogen activator) (tPA) とHAとを臨床学的投与量で混合し、上の実験例に述べたように、HAを注入することである。HAは、血餅 (blood clots) 中の血小板に対してtPAを直接に向かわせ、その結果、薬剤が効くべき特異的部位に運ぶ。

【0049】

【実施例】以下に記載された実験は、血小板凝集及び粘着を阻害する機能におけるHAの効果を述べるものであ

る。

1. 出血時間におけるHAの効果

この実験は、PBS (1.5×10^6 から 2.0×10^6 ダルトン) 中の0.4%HAの大量非経口注入の効果を調べることを意図したものであり、それは動物の測定された血液体積の2.5%、5%、あるいは10%いずれかに等しい。血流、ガス交換 (gas exchange)、血液病理、そして凝固のパラメーターは、以下に記述したように調べられた。PBSだけの分離注入 (それぞれの動物の血液体積の10%に等しい) を、コントロールとして用いた。健康な雄のヒヒ ($n=6$) をこの実験に用いたが、体重は27から36kgの間であった (平均30.2kg)。

【実験方法】実験の約1週間前、それぞれのヒヒの赤血球の体積を、 ^{51}Cr ラベルされた自己由来の赤血球によって調べ、血漿体積は ^{125}I ラベルされたアルブミンによって調べた。本データを用いて、それぞれの動物の循環血液体積の2.5%、5%、あるいは10%いずれかに相当する、注入された体積を決定した。それぞれの動物個体を、それ自身のコントロールとして供し、それらを4つの場合に関して調べた。すなわち、血液体積10%に等しい量のPBSの注入 (コントロール) 後に調べ、更に、全血液体積の2.5%、5%、あるいは10%いずれかに相当する量の試験物質の注入の後にも調べた。コントロールまたは試験物質を注入する順番は、ランダムに行った。それぞれの注入の最初の試験日に、動物を筋肉内にケタミン (4mg/kg) を投与して麻酔し、麻酔を維持する必要に応じて繰り返した。平均動脈圧測定のために右大腿動脈にカニューレを挿入した。幹静脈圧、平均肺動脈圧、平均肺動脈ウェッジ圧、心拍出量の測定のため、流動管理された肺動脈熱希釈カテーテル (flow-directed pulmonary arterial thermodilution catheter) を、右側面内頸静脈を通して挿入した。定常状態に達した後、ベースラインサンプルをとり、続いて試験物質またはコントロール物質のいずれかの静脈内注入を15分間以上行った。サンプリングは、注入の前、注入の後0.5、1、4、6時間、1、2、3、7、14、21、28日後に行った。

【0050】ヘマトクリット、ヘモグロビン、赤血球計測、白血球計測、血小板計測、平均血小板体積を、自動化細胞計測機 (Model JT, coulter Corp., Hialeah, FL) を用いて、上述したそれぞれのタイムポイントにおいて計測した。全血液粘度は、浸透型担床粘度測定計 (porous bed viscometer) (Crowley et al., Am J Cl inPathol 96:729, 1991) を用いて計測した。血液pH、 pO_2 、 pCO_2 、ナトリウム、カリウム、イオン化カルシウム、 $\%\text{O}_2$ ヘモグロビン、 $\%\text{CO}$ ヘモグロビン、体積 $\%\text{O}_2$ 、メトヘモグロビンは、自動化血液ガス分析機 (NovaStat Profile 4, Nova Biomedical, Waltham, MA) を用いて測定した。平均動脈圧、幹静脈圧、平均肺動脈圧、平均肺

動脈ウェッジ圧は、大腿及び肺動脈それぞれにカテーテルを挿入することによって測定した。出血時間は、シンプレートII出血時間装置 (Simplate II bleeding time device) (Organon Technika, Oklahoma City, OK) を用いた標準化傷を作ることで、測定した。体内温度 (core temperature) は、実験当日は肺動脈中で、注入後1日から28日は食道中で調べたが、これには食道に設置した肺動脈カテーテルを用いた。前腕部の皮膚温度は、熱電対 (Mon-A-Therm) と赤外レーザー走査装置 (Exergen) を用いて調べた。肺機能は、呼吸速度、 pO_2 、 pCO_2 、呼出された気体の体積を測定することによって調べた。呼出された気体は、ダグラスバッグ (Douglas bag) に集め、 pO_2 と pCO_2 はノバ・スタット・プロファイル・4装置 (Nova Stat Profile 4 instrument) を用いて測定した。尿排出を実験を通じてモニターし、尿サンプルは、BUNとクレアチニンを続いて測定するために、冷凍した。赤血球p50は、ヘモキシアナライザーを用いて測定した。

【0051】加えて、各々のタイムポイントで得られた血液サンプルの一部は、後の様々な判定基準の測定のため、冷凍した。プロトロンビン時間、パーシャル・トロンボプラスチン時間、トロンビン時間、フィブリノーゲンは、自動化クロッティング装置 (Coag-A-Mate, Organon Technika) を用いて測定した (Feingold et al., Am J Vet Res 47:2197-2199, 1986)。アンチトロンビンII (Helena Laboratories) は、色素形成アッセイを用いて測定した (Abildgaard et al., Thromb Res 11:549-553, 1977)。プロテインCは、アメリカバイオプロダクツ社 (America Bioproducts Co.) により供給された色素形成アッセイによって測定した (Nicham et al., CBS 6 5:25)。フォン・ウィルブランド因子とD-ダイマーレベル (D-dimer levels) は、ELISAアッセイを用いて測定したアメリカバイオプロダクツ社 (America Bioproducts Co.) により供給された (Ness et al., Thromb Haemost 42:848, 1979; Rylatt et al., Thromb Res 31:767, 1983)。フィブロンネクチンは、免疫混濁測定アッセイによって測定した (ベーリンガー・マンハイム社 (Boehringer Mannheim Biochemicals) により供給された) (Saba et al., JLab Clin Med 98:482, 1981)。血清及び尿素窒素 (BUN)、クレアチニン、全タンパク、アルブミン、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (SGPT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (SGOT) は、自動化化学分析機によって測定した (Beckman Instruments Inc., Brea, CA)。C3a及びC5a異常アルギニン (C3a and C5a dys Arg) は、放射免疫アッセイを用いて測定した (アマシャム社 (Amersham Corp.) によって供給された) (Chenoweth et al., N Engl J Med 304:497, 1981)。出血時間中に腕部から採取した血中のトロンボキサンB2レベルの測定は、放射免疫アッセイによって決定した (ニューイング

ランドニュークリアー社 (New England Nuclear Corp.) から供給された)。赤血球ATPとDPGは、フーランド蛍光測定機を用いて測定された (Lamprecht et al., In Methods of Enzymatic Analysis, HU Bergmeyer (ed), pp. 543-558, New York: Academic Press; Keitt, Am J Med 41: 762-785, 1966)。

〔統計的解析〕データは、繰り返し測定による分散一向解析 (one-way analysis of variance) (ANOVA) とスチューデント・ニューマン・ケウルス試験 (Student-Newman-Keuls test) によって調べた。統計的有意性は、 $p < 0.05$ で達成した。統計的解析の結果は、表1から9に示してある。

・ 2. 5%及び5%グループ

測定したヒビの血液体積の2.5%及び5%に相当する体積の0.4%HA (PBS中) のヒビへの注入は、コントロール注入と比較したあらゆる測定パラメーターにおいて、なんら大きな影響を示さなかった。

・ 10%グループ

循環血液体積の10%に相当する量の0.4%HA溶液の注入の後、幹静脈圧、心拍速度、肺動脈圧には、大きな変化はなかった。これら動物は、注入 (+10%の変化) に続くはじめの30分間に平均動脈圧の強い増大を示したが、そうした結果は、コントロールでは観察されなかった (図1)。心拍量量ははじめの1時間で大きく減少した (-13%の変化) が、4時間以内にベースラインに戻った (図2)。血液粘度 (+52%の変化)、全身性血管抵抗 (+26%の変化)、肺血管抵抗 (+34%の変化) は対応して増大したが、4から6時間以内に注入前レベルへ徐々に戻ることが観察された (図3)。10%HA/PBSを注入したヒビでは、動脈 O_2 と静脈 pO_2 が極めて低かった (図4)。ヘマトクリット、白血球測定、血小板測定は注入に続いては変化はなかった。しかしながら10%グループでは、出血時間は、コントロールの2倍のレベルにまで、大幅に減少した。これは、注入後72時間、高い効果を上げ続けた (図5)。

【0052】注入に続いて48時間後まで測定された血清BUN及びクレアチニン値は、PBSのみの場合と10%HA/PBSを注入された場合のヒビと類似していた (図6)。プロトロンビン時間、パーシャル・トロンボプラスチン時間、トロンビン時間、フィブリノーゲンのレベルは、大きな変化はなかった。プロテインCレベルとフォン・ウィルブランド因子は、HA/PBSを注入したヒビにおいて、極めて低かった (図7と8)。赤血球p50、赤血球ATP、赤血球2,3 DPG活性は、コントロールと比較したとき、10%HA/PBSで処理した動物は変化していなかった。加えて、全タンパク、アルブミン、SGOT、SGPT、LDHは、10%注入によっては変化しなかった (図9、10、11)。

【0053】HAは、血清の通常の構成成分であり、わず

か数分の半減期で、血管内で早急に代謝される (Laurent et al., FASEB J 6:2397, 1992)。このことによつて、循環血液体積の 2.5%あるいは 5%に相当する量の 0.4%HA溶液の注入では、測定したさまざまなパラメーターにはっきりした効果がみられなかったかが説明されていると考えられる。HAの清掃率は、ミカエリス-メンテンの速度論によって述べる事が可能であるが (Laurent et al., supra)、10%体積分を注入すると、最大代謝速度 (V_{max}) を短時間で越え、その結果、一時的な血液粘度の増大を生じていると考えられる。全体の血液の粘度は、通常体内に拡散しているヘマトクリットに依存しているが、ヘマトクリット (及び動脈酸素容量) を一定にした場合の粘度の変化は、心拍出量と全身血管抵抗における独立した変化を引き起こすことが可

能である (Murray et al., Am J Physiol 216:638, 1969)。加えて、HAを含む溶液は、全血液のように、粘度がせん断速度に強く依存する非ニュートン様 (non-Newtonian fashion) にふるまう (Laurent, supra)。これは、理論上、微小循環における問題を引き起こす可能性がある。そこでは、低いせん断速度に伴って増加する粘度が、うっ血と血管内でのスラッジング (sludging) を誘導する可能性がある (Replogle et al., Circulation 36:148, 1967)。しかし本測定において、少なくとも微小循環機能の間接的な測定については (腎臓及び肝臓の機能指標については)、このようなことは観察されなかった。

【0054】

【表1】

時間と処理の効果及び時間と処理の相互作用

1. 注入後 6 時間までの測定されたパラメーター：注入前、0.5、1、4、6（時間）
 血行、血液ガス及び p H、一酸化炭素、メトヘモグロビン、電解質、輸注された
 食塩水、尿排泄

分散の解析（注入された体積：2.5 %）

<u>パラメーター</u>	<u>時間の効果</u>	<u>HA処理の効果</u>	<u>時間に関する HA（処理）の 相互作用</u>
心拍速度	.0348	NS	NS
MAP	NS	NS	NS
CVP	NS	NS	NS
MPA	.0292	NS	NS
MPAW	.0003	NS	NS
心拍出量			
呼吸			
動脈pH	NS	NS	NS
動脈pCO ₂	.0149	NS	NS
動脈pO ₂	NS	NS	NS
静脈pH	NS	NS	NS
静脈pCO ₂	.0539	NS	NS
静脈pO ₂	.0213	NS	NS
動脈O ₂ 飽和	NS	NS	NS
静脈O ₂ 飽和	.0003	NS	NS
動脈O ₂ 含量	.0021	NS	NS
静脈O ₂	.0003	NS	NS
メトヘモグロビン	NS	.0436*	NS
一酸化炭素	NS	NS	NS
静脈Na+			
静脈Cl-			
食塩水Tx			
尿排泄	.0352	NS	NS

2. 注入後72時間まで測定したパラメーター：注入前、0.5、1、4、6、24、48、72

(時間)

皮膚及び体内温度、出血時間、粘度、クロッティング、腫脹及びオプソニンのタンパク質、p50、2, 3 DPG、ATP、及びプラズマヘモグロビン

<u>パラメーター</u>	<u>時間の効果</u>	<u>HA処理の効果</u>	<u>時間に関する HA(処理)の 相互作用</u>
皮膚温度	.0001	NS	NS
体内温度	.0001	NS	NS
出血時間	.0292	NS	NS
せん断血液TXB2			
粘度	.0001	NS	NS
PT			
PTT			
トロンビン時間			
フィブリノーゲン			
D-ダイマー			
抗トロンビンIII			
プロテインC			
フォンウィルブランドの			
フィブ्रोネクチン			
TP			
アルブミン			
p50			
2, 3 DPG			
ATP			
プラズマヘモグロビン			

【0056】

【表3】

3. 注入後28日まで測定したパラメーター： 注入前、0.5、1、4、6、24、48、72、
168、336、504、672（時間）

<u>パラメーター</u>	<u>時間の効果</u>	<u>HA処理の効果</u>	<u>時間に関する HA（処理）の 相互作用</u>
血清BUN			
血清クレアチニン			
血清SGPT			
血清SGOT			
血清LDH			
Hct	.0001	NS	NS
Hb	.0001	NS	NS
RBC	.0001	NS	NS
WBC	.0001	NS	NS
血小板数	.0001	NS	.0146
平均血小板体積	.0001	NS	NS

【0057】

【表4】

時間と処理の効果及び時間と処理の相互作用

1. 注入後 6 時間までの測定されたパラメーター：注入前、0.5、1、4、6(時間)
 血行、血液ガス及び pH、一酸化炭素、メトヘモグロビン、電解質、輸注された
 食塩水、尿排泄

分散の解析 (注入された体積：5%)

<u>パラメーター</u>	<u>時間の効果</u>	<u>HA処理の効果</u>	<u>時間に関する HA(処理)の 相互作用</u>
心拍速度	.0371	NS	NS
KAP	.0111	NS	NS
CVP	.0053	NS	NS
MPA	NS	NS	NS
MPAV	.0030	NS	NS
心拍出量			
呼吸			
動脈pH	NS	NS	NS
動脈pCO ₂	NS	NS	NS
動脈pO ₂	NS	NS	NS
静脈pH	NS	NS	NS
静脈pCO ₂	NS	NS	NS
静脈pO ₂	NS	NS	.0463
動脈O ₂ 飽和	NS	NS	NS
静脈O ₂ 飽和	NS	NS	NS
動脈O ₂ 含量	.0029	NS	NS
静脈O ₂	.0105	NS	NS
メトヘモグロビン	NS	.0459*	NS
一酸化炭素	NS	NS	NS
静脈Na+			
静脈Cl-			
食塩水Tx			
尿排泄	.0352	NS	NS

【0058】

40 【表5】

2. 注入後 72 時間まで測定したパラメーター：注入前、0.5、1、4、6、24、48、72 (時間)

皮膚及び体内温度、出血時間、粘度、クロッティング、腫脹及びオブソニンのタンパク質、p50、2, 3 DPG、ATP、及びプラズマヘモグロビン

<u>パラメーター</u>	<u>時間の効果</u>	<u>HA処理の効果</u>	<u>時間に関する HA (処理) の 相互作用</u>
皮膚温度	.0001	NS	NS
体内温度	.0006	NS	NS
出血時間	.0181	NS	NS
せん断血液TXB2			
粘度	.0001	NS	NS
PT			
PTT			
トロンビン時間			
フィブリノーゲン			
D-ダイマー			
抗トロンビンIII			
プロテインC			
フォンウィルブランドの			
フィブ्रोネクチン			
TP			
アルブミン			
p50			
2, 3 DPG			
ATP			
プラズマヘモグロビン			

【0059】

【表6】

3. 注入後 28 日まで測定したパラメーター：注入前、0.5、1、4、6、24、48、72、168、
336、504、672（時間）

腎臓の、肝臓の、及び、血液学的パラメーター

<u>パラメーター</u>	<u>時間の効果</u>	<u>HA処理の効果</u>	<u>時間に関する</u> <u>HA（処理）の</u> <u>相互作用</u>
血清BUN			
血清クレアチニン			
血清SGPT			
血清SGOT			
血清LDH			
Hct	.0001	NS	NS
Hb	.0001	NS	NS
RBC	.0001	NS	NS
WBC	.0001	NS	NS
血小板数	.0001	NS	NS
平均血小板体積	.0004	NS	NS

【0060】

【表7】

時間と処理の効果及び時間と処理の相互作用

1. 注入後 6 時間までの測定されたパラメーター：注入前、0.5、1、4、6（時間）
 血行、血液ガス及び pH、一酸化炭素、メトヘモグロビン、電解質、輸注された
 食塩水、尿排泄

分散の解析（注入された体積：10%）

<u>パラメーター</u>	<u>時間の効果</u>	<u>HA処理の効果</u>	<u>時間に関する HA（処理）の 相互作用</u>
心拍速度	0.0127*	0.5810	0.3410
MAP	0.0057*	0.7820	0.0029*
CVP	0.343	0.6490	0.1488
MPA	0.0677	0.3870	0.6271
MPAW	0.0041*	0.0260*	0.2721
心拍出量	0.8612	0.1295	0.0006*
呼吸	0.0072*	0.9395	0.1393
動脈pH	0.8287	0.2338	0.9928
動脈pCO ₂	0.0257*	0.3454	0.7003
動脈pO ₂	0.4271	0.3423	0.7644
静脈pH	0.3598	0.7703	0.8216
静脈pCO ₂	0.0073*	0.5153	0.8591
静脈pO ₂	0.0114*	0.2904	0.0214*
動脈O ₂ 飽和	0.0003*	0.1678	0.0050*
静脈O ₂ 飽和	0.0020*	0.2671	0.0135*
動脈O ₂ 含量	0.0032*	0.5343	0.4442
静脈O ₂	0.0001*	0.6279	0.1254
メトヘモグロビン	0.0001*	0.0317*	0.0001*
一酸化炭素	0.0060*	0.7206	0.2626
静脈Na ⁺	0.0044*	0.9120	0.9206
静脈Cl ⁻	0.2386	0.9302	0.9587
食塩水Tx	0.0001*	0.1545	0.3500
尿排泄	0.0203*	0.7612	0.0473*

【0061】

【表8】

2. 注入後72時間まで測定したパラメーター：注入前、0.5、1、4、6、24、48、72
(時間)

皮膚及び体内温度、出血時間、粘度、クロッティング、腫脹及びオプソニンのイ
ンパク質、p50、2, 3 DPG、ATP、及びプラズマヘモグロビン

<u>パラメーター</u>	<u>時間の効果</u>	<u>HA処理の効果</u>	<u>時間に関する HA(処理)の 相互作用</u>
皮膚温度	0.0001*	0.8369	0.1373
体内温度	0.2120	0.7787	0.8103
出血時間	0.0003*	0.0062*	0.0001*
せん断血液TXB2	0.1601	0.5342	0.8583
粘度	0.0001*	0.0194*	0.0002*
PT	0.0052	0.7337	0.2202
PTT	0.0033*	0.7588	0.4737
トロンビン時間	0.0001*	0.9433	0.5124
フィブリノーゲン	0.0001*	0.4573	0.0673
D-ダイマー	0.0005*	0.5221	0.1635
抗トロンビンIII	0.0004*	0.6052	0.1895
プロテインC	0.7756	0.7879	0.0084*
フォンウィルブランド	0.0535	0.7926	0.0112*
フィブロネクチン	0.0208*	0.3894	0.5720
TP	0.0001*	0.0754	0.6677
アルブミン	0.0899	0.3915	0.2630
p50	0.0316*	0.1838	0.2080
2, 3 DPG	0.0019*	0.2292	0.1166
ATP	0.1202	0.2661	0.0888
プラズマヘモグロビン	0.3590	0.7592	0.7843

【0062】

【表9】

3. 注入後28日まで測定したパラメーター：注入前、0.5、1、4、6、24、48、72、168、336、504、672（時間）

腎臓の、肝臓の、及び、血液学的パラメーター

パラメーター	時間の効果	HA処理の効果	時間に関する HA（処理）の 相互作用
血清BUN	0.9810	0.9662	0.0011*
血清クレアチニン	0.1927	0.8304	0.1944
血清SGPT	0.0001*	0.5060	0.8706
血清SGOT	0.0001*	0.8115	0.8173
血清LDH	0.0001*	0.7189	0.5675
Hct	0.0001*	0.0974	0.7221
Hb	0.0001*	0.0351*	0.9951
RBC	0.0001*	0.6320	0.5396
WBC	0.0001*	0.8738	0.8379
血小板数	0.0001*	0.0240*	0.2245
平均血小板体積	0.0001*	0.7362	0.1315

2. 血小板相互作用におけるHAの役割

粘着が起こるためには、血小板は血管壁と接触しなくてはならず、その後、内皮下マトリックスの構成成分に広がらなくてはならない。血小板表面膜は、特異的マトリックス分子に結合するための粘着レセプターを有している。これらレセプターは、糖蛋白 (gp) Ib-IX、内皮下フォン・ウィルブランド因子のレセプター、粘着レセプターのインテグリンスーパーファミリーの膜グリコプロテインのいくつかを含んでいる。ここでいうスーパーファミリーとは、gpIa/IIa（コラーゲンレセプター）、gpIc/IIa（フィブロネクチンレセプター）、gpIc'/IIa（ラミニンレセプター）、 $\alpha v \beta 3$ （ビトロネクチンレセプター）である。加えて、マトリックスの多くの構成成分（例えばフォン・ウィルブランド因子、トロンボスポンジン、フィブロネクチン、コラーゲン）は、血小板と作用すると同様に、相互に作用することができる。いったん活性化が起これば、他の血小板-膜インテグリン (gpIIb/IIIa) が、フォン・ウィルブランド因子とフィ

ブロネクチンに結合する用意がととのい、内皮下マトリックス上に血小板が広がることに関与する。
【0063】リストセチンは、血小板上のグリコプロテインIbレセプターに結合するvWFの、モノフェージックな (monophasic) 凝集反応を誘導することによる血小板の凝集を、特異的に促進する薬剤である。vWFがgpIbに結合した後、血小板はADPとセロトニンを放出するが、いずれも効果的な血小板凝集物質である。それゆえ、我々は、以下の実験において、血小板のgpIbレセプターに

結合するフォン・ウィルブランド因子によって起こる血小板凝集に対する、HAの効果調べた。

【0064】血小板凝集は、以下のように、シリーズ1000B・ペイトン・サイエンティフィック・蛍光凝集測定機 (Series 1000B Payton Scientific Lumi-Aggregometer) を用いて行われた。クエン酸ナトリウムで抗凝集化した新鮮な全血液を、 $200 \times g$ で10分間遠心し、上層のPRP層を分離することによって、血小板に富む血漿 (PRP) を、調製した。PRPは、血小板に乏しい血清 (10 分間 $100 \times g$ で2回血液を遠心することで、調製した) で、 $30000/\mu l$ にした。 $400 \mu l$ のPRPを、 $50 \mu l$ の0.4% w/w HA溶液 (分子量 2×10^6 、10%最終濃度)、あるいはPBSキャリアバッファに加えた。 $37^\circ C$ で5分間のインキュベーションの後、 $50 \mu l$ の12mg/mLリストセチン (Bio/Data Corp) を加えて、凝集反応 (これは、血小板gpIbレセプターと血漿vWFが介在する) を誘導した。サンプルの光伝導の変化を、リストセチンの添加後5分間モニターした。初期速度は、最初の計測時間の間に得られた凝集の最大勾配である。

【0065】凝集反応の傾きと凝集カーブのバイフェイズな形 (biphasic shape) は、HAが、vWFと血小板gpIbレセプターの相互作用によって誘導された血小板凝集を阻害していることを示している。

【0066】2つめの実験は、vWF-gpIbに誘導された血小板凝集の阻害が、HAに特異的であるかどうかを決定するために行われた。それ故、本発明者らは、HAを他のポ

リ陰イオン性ポリサッカライド、カルボキシメチルセルロース (CMC) と比較した。本研究では、CMC 溶液をテストした。CMC-1 溶液は、適切な粘度 [350 センチポウズ (2.2 sec⁻¹)] において 0.7% CMC (ロット/7H3SF) であった。CMC-2 溶液は、適切な粘度 [350 センチポウズ (2.2 sec⁻¹)] において 2% CMC (ロット/7MFPH) であった。CMC 溶液は、HA 溶液とほぼ同じ粘度に調整し、上の実験例で記載したように、リストセチン凝集に関して比較した。リストセチンで誘導された血小板凝集の量は、CMC と比較すると、HA 処理をすることで極めて少なくなった (図 13) が、このことは、血小板凝集における HA の効果が、HA に関して特異的であるが、一般的なポリ陰イオン性溶液の粘度とは関係しないということを示している。

【0067】外輪 (external ring) によって冠状血管狭窄をおこしているフォン・ウィルブランド症の豚が、正常な豚とは対照的に、血管閉塞を開くことができない、という知見がある (Nichols et al., Circ. Res. 59:15, 1986; Badimon et al., Circulation 78:1431, 1988)。ヘパリン投与された、また抗凝集処理されていない血液いずれにおいても、高い局所的壁せん断速度 (high local wall shear rates) (狭窄した、または微小の循環流動) において、vWF の欠如が血小板血栓形成の減少をもたらすという報告、また、ヘパリンで施した抗凝集と比較して、血小板沈澱においてかなり大きな減少を示す、という報告もなされている。そして、狭窄性心臓血管症と関連する血栓の合併症において、vWF は重要な役割を担っているらしいということ、また、急性血栓反応は、他の因子の場合より、vWF の操作に対してより感受性が高くなるらしいと結論づけられた。

【0068】従って、HA が vWF の機能を特異的に妨げるという我々の実験結果は、生命を脅かす、あるいは脅か

すようになる危険性をはらんでいる血栓状態の処置にあたって、HA が臨床的に重要であることを明確にしている。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 動脈圧における HA 注入の影響を示した棒グラフである。

【図 2】 心臓の拍出における HA 注入の影響を示した棒グラフである。

【図 3】 血液の粘性における HA 注入の影響を示した棒グラフである。

【図 4】 動脈の酸素における HA 注入の影響を示した棒グラフである。

【図 5】 出血時間における HA 注入の影響を示した棒グラフである。

【図 6】 血清 BUN 値の血液体積 10% における HA 注入の影響を表現した図である。

【図 7】 タンパク C レベルにおける HA 注入の影響を表現した図である。

【図 8】 vWF レベルにおける HA 注入の影響を表現した図である。

【図 9】 血清 LDH における HA 注入の影響を表現した図である。

【図 10】 血清 SGPT における HA 注入の影響を表現した図である。

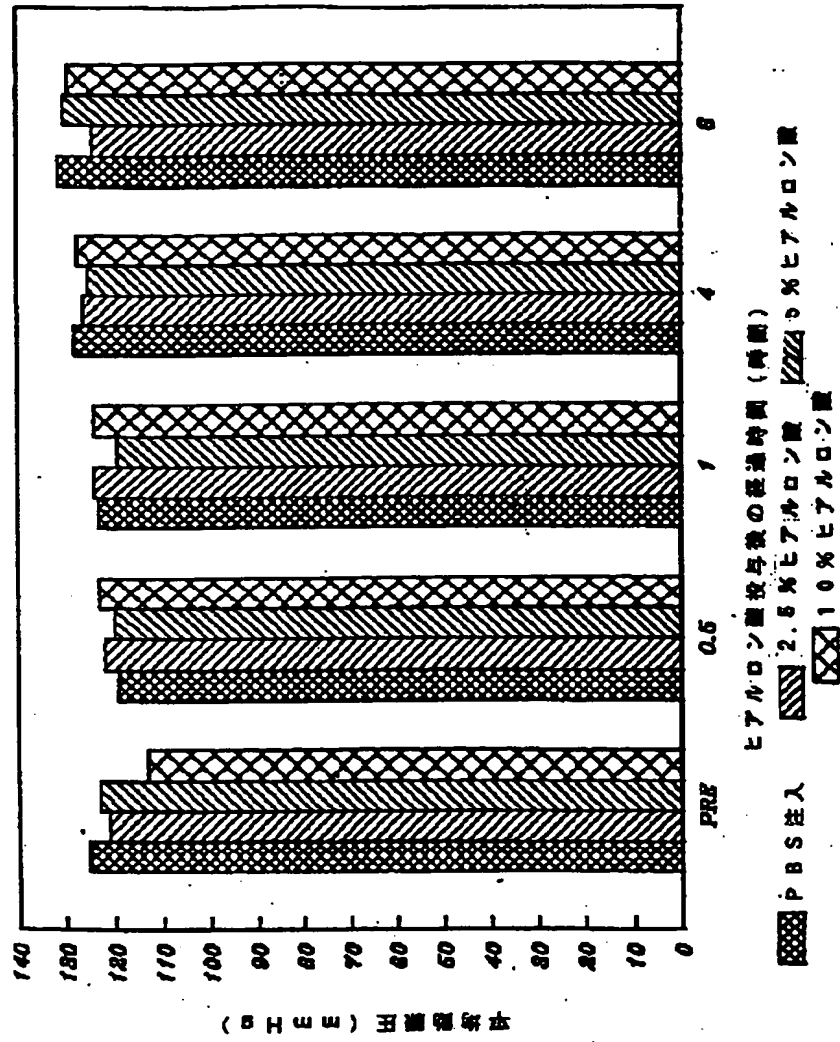
【図 11】 血清 SGOT における HA 注入の影響を表現した図である。

【図 12】 A と B は、リストセチンで誘導した血小板凝集アッセイにおける、PBS コントロール (図 12A)、あるいは 10% HA (図 12B) で処理した血小板サンプルの光透過率の分光測定を示したものである。

【図 13】 リストセチンで誘導した血小板凝集における HA と CMC の影響を示した棒グラフである。

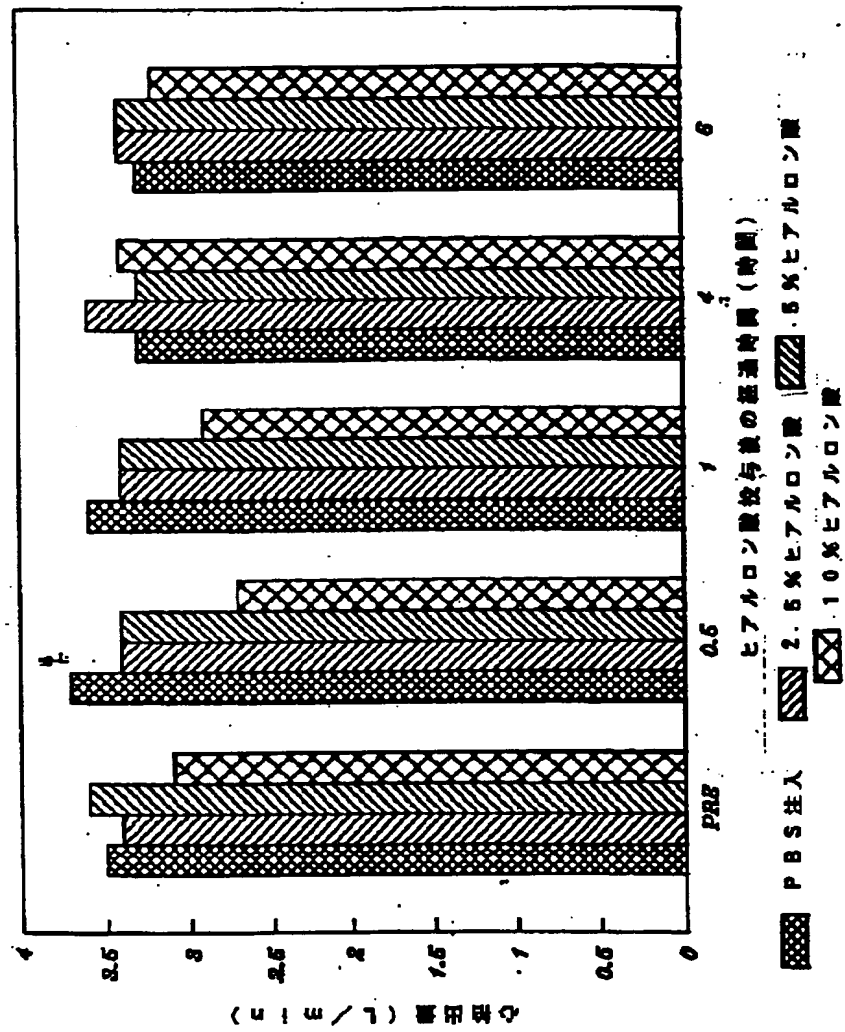
【図1】

0.4GM%ヒアルロン酸の注入
平均動脈圧の効果



【図2】

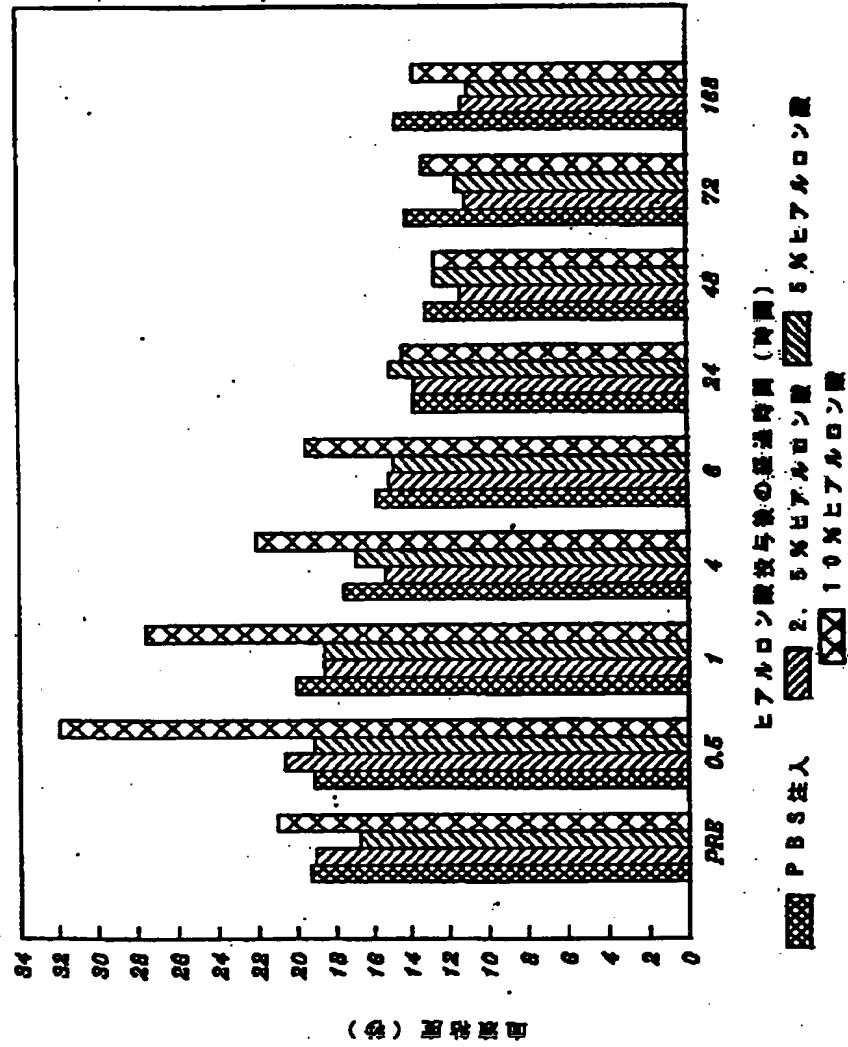
0.4GM%ヒアルロン酸の注入
心拍出量の効果



【図3】

0. 4GM%ヒアルロン酸の注入

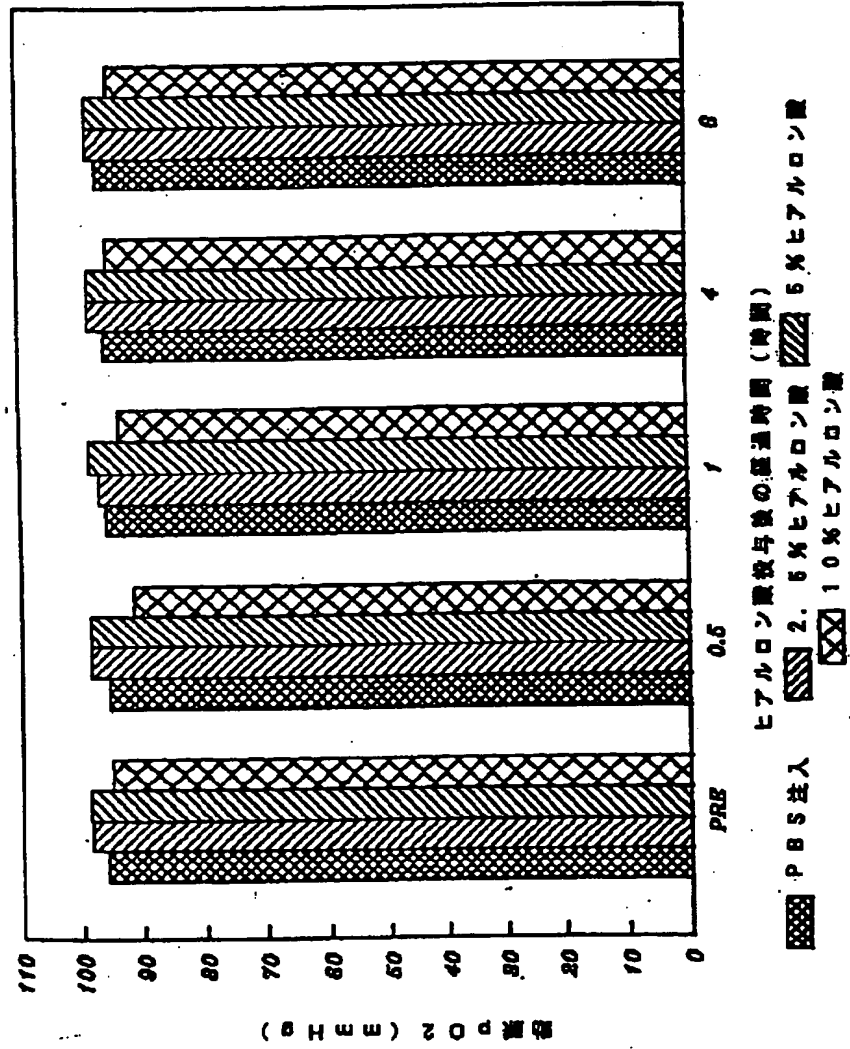
出血時間の結果



【図4】

0.4GM%ヒアルロン酸の注入

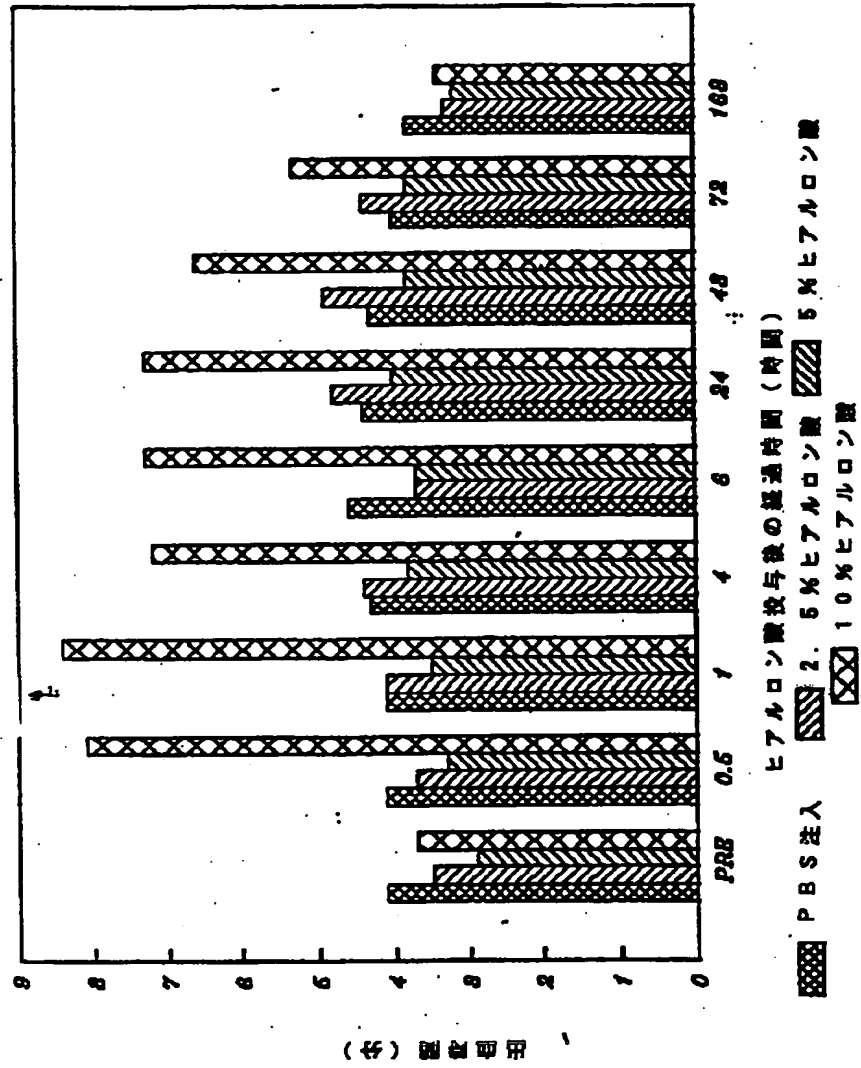
出血時間の効果



【図5】

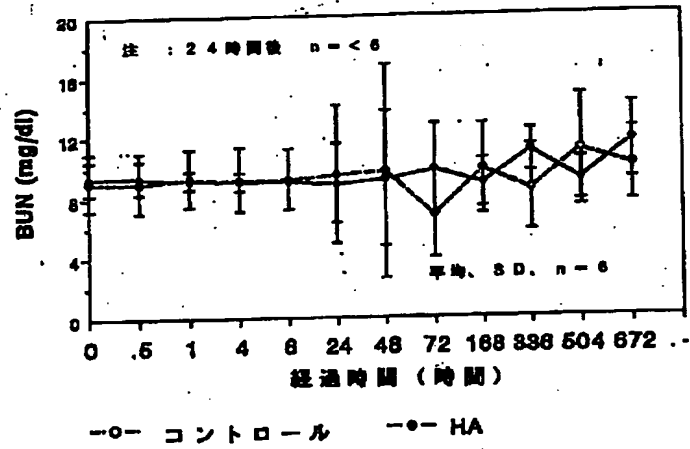
0.4GM%ヒアルロン酸の注入

出血時間の効果



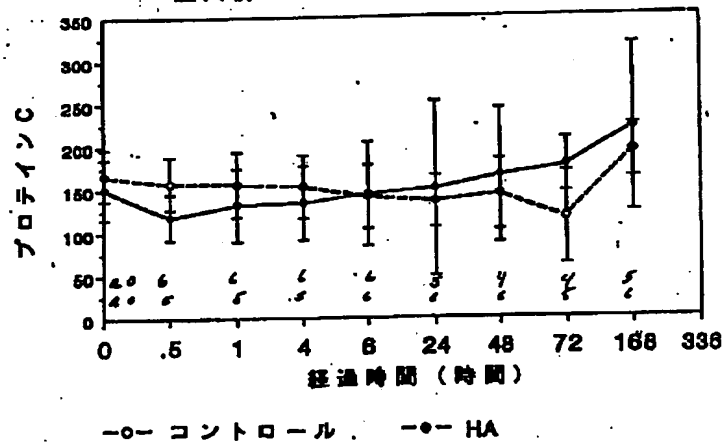
【図6】

血液体積の10%に相当するHAの、
注入前及び注入後の血清BUN



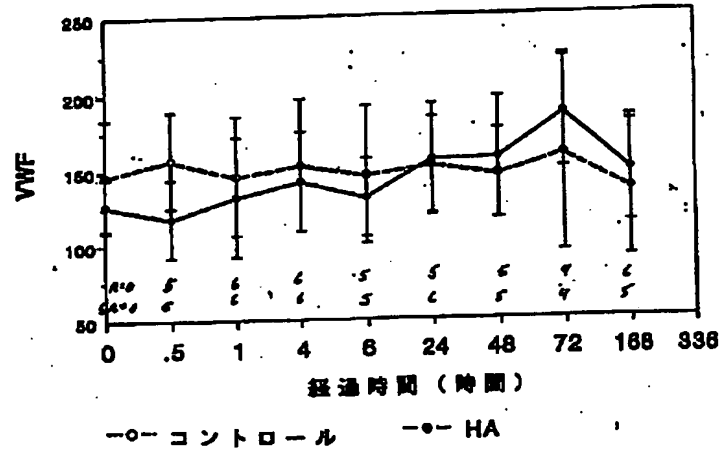
【図7】

血液体積の10%に相当するHAの、
注入前及び注入後のプロテインC



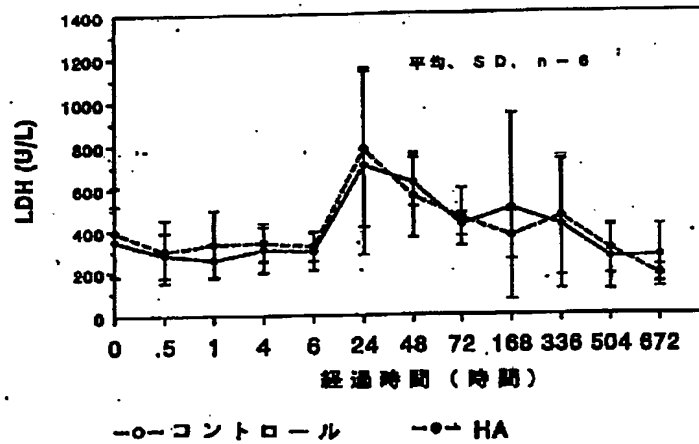
【図8】

血液体積の10%に相当するHAの、
注入前及び注入後のVWF



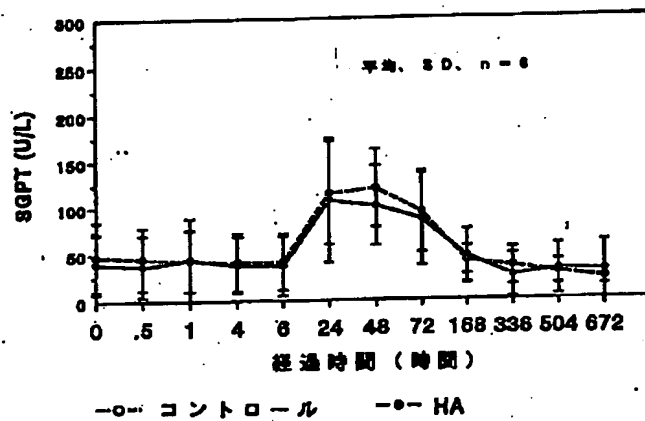
【図9】

血液体積の10%に相当するHAの、
注入前及び注入後の血清LDH



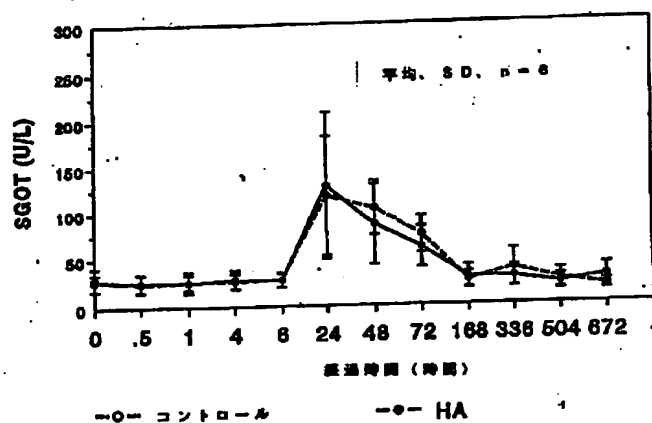
【図10】

血液体積の10%に相当するHAの、
注入前及び注入後の血清SGPT

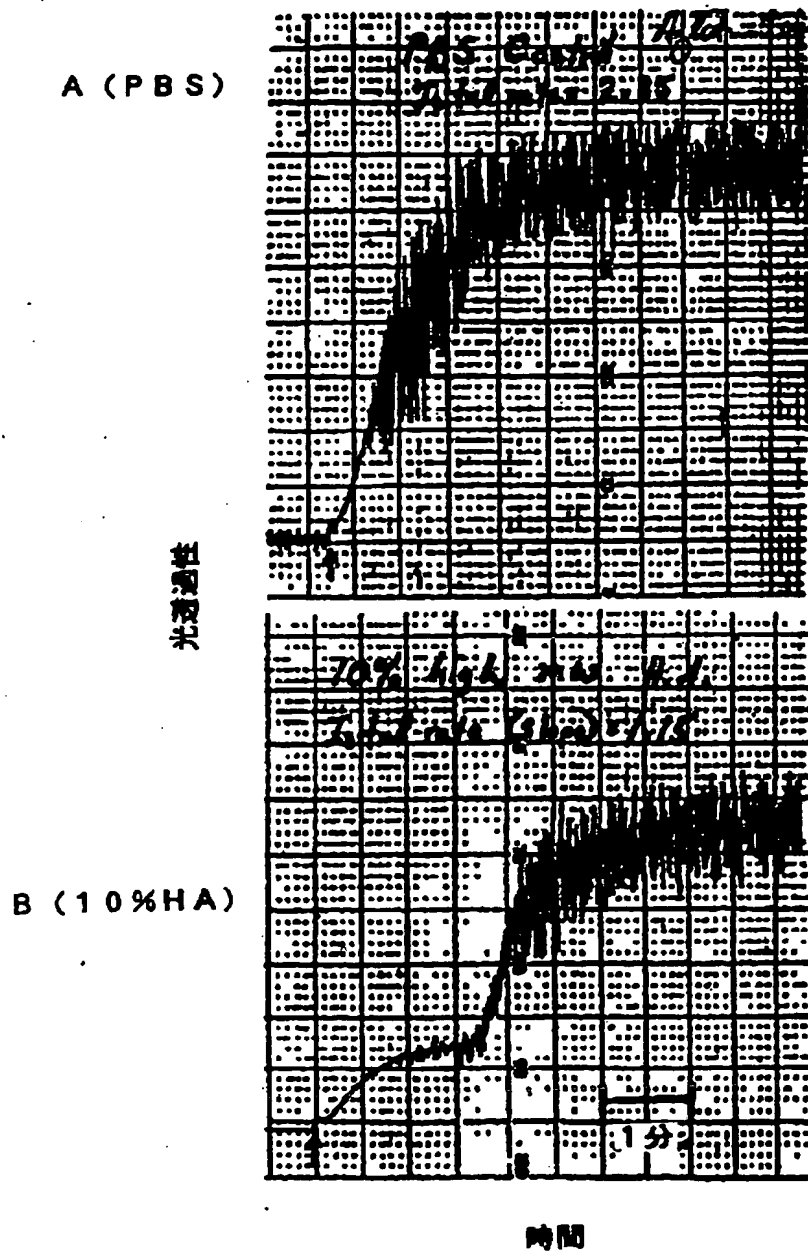


【図11】

血液体積の10%に相当するHAの、
注入前及び注入後の血清SGOT

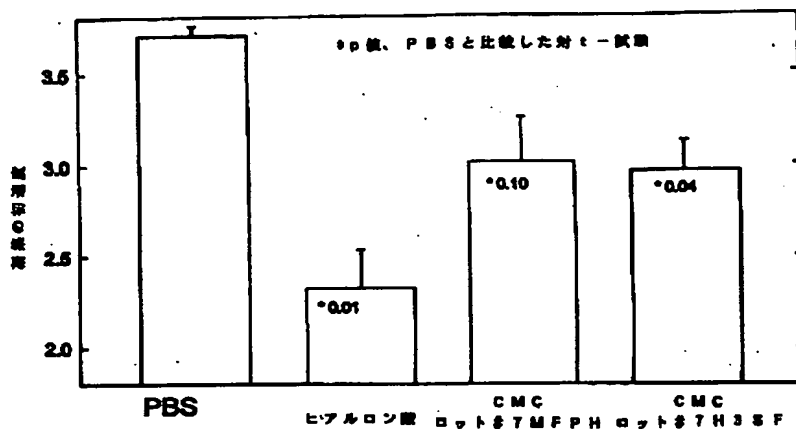


【図12】



【図13】

ヒアルロン酸は、同じ粘度に調整されたカルボキシメチルセルロースよりも、リストセチンによって誘導される凝集速度を阻害する



フロントページの続き

(72)発明者 ジェイムズ ダブリュ. パーンズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
ストン #23ジー タワー 1 イー.
インディア ロウ 85

(72)発明者 セザーレ アール. ヴアレリ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 マ
ーブルヘッドオーシャン アベニュー
372